基础研究

Apelin-13对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤的保护作用

吴光勇[1],李 亮[2],廖达光[1],王知非[1]
[1]中南大学湘雅三医院神经外科,湖南 长沙 410013;[2]湖南省娄底市中心医院神经外科,湖南 娄底 417000

摘要:目的 探讨Apelin-13对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤(CIRI)的保护作用及其可能的机制。**方法** 改良线栓法建立S-D大鼠局灶性CIRI模型,分假手术组、模型组、小剂量Apelin-13干预A组、中剂量B组、大剂量C组共5组,Apelin-13进行侧脑室注射,分别进行神经功能评分,脑水肿、脑梗死体积测定,观察细胞凋亡;检测脑组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性和细胞外调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2)。**结果** (1)B、C组较模型组神经功能评分降低(P<0.05),含水量、脑梗死体积降低(P<0.05);模型组梗死组织可见水肿、坏死,较多深染、固缩核细胞;B组、C组TUNEL阳性细胞数低于模型组(P<0.05);(2)B、C组缺血周边脑组织MDA含量降低,SOD的活性增加(P<0.05);(3)各组ERK1/2蛋白表达无差异性(P>0.05);模型组和干预组p-ERK1/2蛋白表达高于假手术组(P<0.05);干预组高于模型组(P<0.05)。**结论** Apelin-13可能通过抑制氧化应激反应对大鼠局灶性CIRI起保护作用;ERK1/2信号通路可能参与了Apelin-13保护作用机制。
关键词: Apelin-13;脑缺血-再灌注损伤;MDA;SOD;ERK1/2

Protective effect of Apelin-13 on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

WU Guangyong[1], LI Liang[2], LIAO Daguang[1], WANG Zhifei[1]
[1]Department of Neurosurgery, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Hunan Province, Changsha 410013, China; [2]Department of Neurosurgery, the Central Hospital of Loudi City, Hunan Province, Loudi 417000, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Apelin-13 on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** Focal transient cerebral ischemia-reperfusion injury was induced in male SD rats using modified suture occlusion technique. The rats were randomly divided into 5 groups: Sham group, Model group, Apelin-low dose (A) group, Apelin-middle dose (B) group and Apelin-high dose (C) group. Apelin-13 was injected into lateral cerebral ventricle, and the neurological function score, brain edema, infarct volume, apoptosis, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and extracellular regulated kinase1/2 (ERK1/2) protein were measured. **Results** Neurological function scores, percentage of brain water content, infarct volumes and TUNEL-positive cells in B and C groups were lower than those in Model group (P<0.05). The level of MDA in the tissue bomogenate of brain tissue in the surrounding area of ischemia of B and C groups was lower than that of Model group, while the activity of SOD was higher (P<0.05). There was no significant difference in ERK1/2 protein expression among the groups (P>0.05). P-ERK1/2 increased in Model group and A, B, and C groups compared with Sham group (P<0.05), and that of A, B, and C group was higher than that of Model group (P<0.05). **Conclusion** Apelin-13 may play an important role by inhibiting oxidative stress to protect against focal cerebral ischemia-reperfusion injury; ERK1/2 signaling pathway may be involved in the protective mechanism of Apelin-13.
Key word: apelin-13; brain ischemia-reperfusion injury; malondialdehyde; superoxide dismutase; extracellular regulated kinase1/2

脑血管疾病(cerebrovascular disease, CVD)是神经系统常见病及多发病,严重威胁人民的身体健康[1],缺血性脑血管病(ischemic cerebrovascular disease, ICVD)占CVD的70%左右。脑缺血梗死后血液再通会出现脑缺血-再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI),其机制十分复杂。Apelin是一种小分子内源性神经肽,是血管紧张素受体样蛋白J受体的天然配体,不仅参与了神经系统的生理功能调节,也与其发生、发展密切相关,具有神经保护作用[2-4]。Apelin可被肽酶分解成多种相对分子量不同的成熟活性肽,以Apelin-13的生物活性最强。本研究拟观察Apelin-13对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤的作用,探讨其作用机制,为CIRI的防治提供新的方法和策略。

收稿日期:2015-03-22
基金项目:湖南省科学技术厅科技计划一般项目(2012FJ4312)
作者简介:吴光勇,博士,主治医师,E-mail: gywu7508@163.com
通信作者:王知非,博士,教授,电话:0731-88618018,E-mail: doctorwangzhifei@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

Apelin-13为美国Sigma公司产品,MDA测试盒和SOD测试盒购自武汉博士德生物工程公司;兔抗ERK1/2多克隆抗体和兔抗p-ERK1/2多克隆抗体为美

国Cell Signaling Biotechnology公司产品。Apelin-13溶解于0.9%的生理盐水中,配置成不同浓度的溶液(单位μg/kg)。

1.2 实验动物与分组

选取8周龄的健康S-D雄性大鼠100只,体质量250~300 g(中南大学实验动物学部提供)。随机分为5组:假手术组(只分离血管20只)、缺血再灌注模型组(20只)、Apelin-13干预组(10 μg/kg为干预A组、50 μg/kg为B组、100 μg/kg为C组,每组20只),再灌注前15 min侧脑室注射Apelin-13溶液5 μL。假手术组和模型组注射相同剂量的生理盐水。每组随机取5只大鼠,断头处死取出整个脑组织,进行2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色,观察梗死的体积;5只大鼠取全脑组织,称取大脑湿质量,然后108 ℃烘烤72 h后,再称干质量;5只大鼠进行TUNEL染色;余下5只大鼠在断头处死后取出全脑组织后,取缺血半暗带脑组织,用于MDA和SOD以及Western blotting检测。

1.3 侧脑室埋管与动物模型制备

所有实验S-D大鼠在实验室恒温、恒湿动物房中适应环境一周,12 h昼夜交替,自由饮食,避免不良刺激。术前禁食12 h,自由饮水,腹腔注射10%水合氯醛麻醉后固定在脑立体定位仪上,矢状缝和冠状缝愈合处向后3~4 mm,中线旁开1.5 mm处,深度为3.5 mm,钻孔埋入插管套管,骨蜡封闭固定。每次注药3 min并留针1 min[5]。埋管后,参照zea-Longa线栓法[6],并略加改进制备大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血模型。颈部正中切口,分离右侧颈总、颈内、外动脉,在动脉分叉处结扎颈外动脉,颈总动脉剪一小口,插入头端呈圆钝形的尼龙鱼线(直径0.28 mm),插入长度约18 mm,在大脑中动脉起始端堵塞动脉。将颈总动脉和尼龙鱼线一起结扎,缝合皮肤。在阻断血流2 h后,通过拔出尼龙鱼线实现再灌注72 h。假手术组只分离血管,不结扎动脉,不插入尼龙鱼线。大鼠苏醒后左侧肢体瘫痪,站立不稳,左上肢屈曲、行走时向左侧转圈的大鼠为造模成功,用于后续实验[7]。

1.4 临床症状观察、肌力检查、神经功能评分

观察肢体瘫痪,站立,肢体屈曲,行走情况。采用Longa[6]的5级4分法进行神经功能评分:无明显神经功能缺损记为0分;左前肢伸展障碍记为1分;行走时向左侧旋转打圈记为2分;行走时向左侧倾倒记为3分;不能自发行走,意识丧失,昏迷记为4分;动物死亡记为5分。评分为0分、4分和5分的大鼠均被剔除,剔除的大鼠在后续实验中得到补充[8]。

1.5 含水量、脑梗死体积计算和TUNEL染色

大鼠脑缺血2 h再灌注72 h后,断头取出全脑,去掉低位脑干、嗅球和小脑,用电子称称取大脑湿质量,然后108 ℃烘烤72 h后,再称取大脑的干质量。脑组织含水量的计算公式为:(湿质量－干质量)/湿质量×100%。大鼠断头处死后完整取出脑组织,将大脑均匀切成5片冠状切片。脑片浸入2% TTC溶液,37 ℃恒温水浴中孵育15 min染色,染色后取出于4%多聚甲醛中固定24 h后,数码相机摄像,红色区域为正常脑组织,苍白色区域为梗死区,相机微距拍摄,Image pro plus 5.1图像分析软件分析并计算脑梗死体积。TUNEL染色时先行缺血再灌注后,麻醉后剪开胸腔,暴露心脏,从左心室快速灌注生理盐水100 mL,然后以4%多聚甲醛200 mL左右灌注固定,石蜡包埋,切片,片厚约为5 μm,相邻切片分别予以TUNEL染色,中性树胶封片,观察脑组织凋亡情况。

1.6 缺血周边区脑组织的MDA、SOD、ERK1/2检测

大鼠断头取出脑组织,然后取缺血周边半暗带脑组织,低温粉碎、高速离心提取脑组织匀浆上清液,按照试剂盒说明书进行操作,采用分光光度法检测脑组织匀浆上清液中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)的活性。提取脑组织总蛋白进行Western Blotting,采用蛋白裂解液试剂盒,按说明书进行操作,远红外荧光扫描成像系统扫描并测定目标带单位密度,β-actin做为参照,以ERK1/2、p-ERK1/2对β-actin的比值代表各组蛋白相对表达水平。

1.7 统计学方法

采用SPSS 13.0统计学软件进行数据分析,计量资料数据用均数±标准差来表示,多组间差异的比较采用单因素方差分析,然后组间差异的两两比较采用LSD-T检验,以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Apelin-13对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经功能缺损的影响

如表1结果所示,模型组神经功能评分明显高于评分为0的假手术组,表明缺血再灌注造成了明显的神经功能缺损。Apelin-13处理后,肌力明显增强,干预B,C组神经功能评分明显低于模型组($P<0.05$),干预A组与模型组差异均无统计学意义($P>0.05$),提示较大剂量Apelin-13能够改善局灶性脑缺血再灌注损伤后的神经功能缺失。

2.2 Apelin-13对脑缺血-再灌注损伤大鼠脑梗死体积的影响

如图1结果所示,假手术组大鼠脑组织TTC染色表现为均匀一致的红色,模型组缺血再灌注侧脑组织TTC染色出现大范围苍白色梗死区域。缺血损伤的体积中模型组为236±21 mm^3,A组187±19 mm^3、B组175±17 mm^3、C组152±15 mm^3,Apelin-13干预后梗死区域体积缩小($P<0.05$),提示Apelin-13能够减轻局灶性脑缺血再灌注损伤后的梗死体积,从而产生神经保护作用。

表1 不同组大鼠Longa神经功能评分

Tab.1 Longa neurological function score in different groups

Group	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Model group	2.84±0.34	2.91±0.27	3.38±0.31	3.30±0.35	2.52±0.24
A group	2.61±0.24	2.81±0.32	3.21±0.40	2.98±0.31	2.34±0.26[∀]
B group	2.32±0.31	2.43±0.26	1.89±0.18	1.26±0.13	0.91±0.12[※]
C group	2.01±0.21	1.85±0.22	1.32±0.24	0.98±0.12	0.68±0.09[※]

[※]$P<0.05$ *vs* Model group, [∀]$P>0.05$ *vs* Model group.

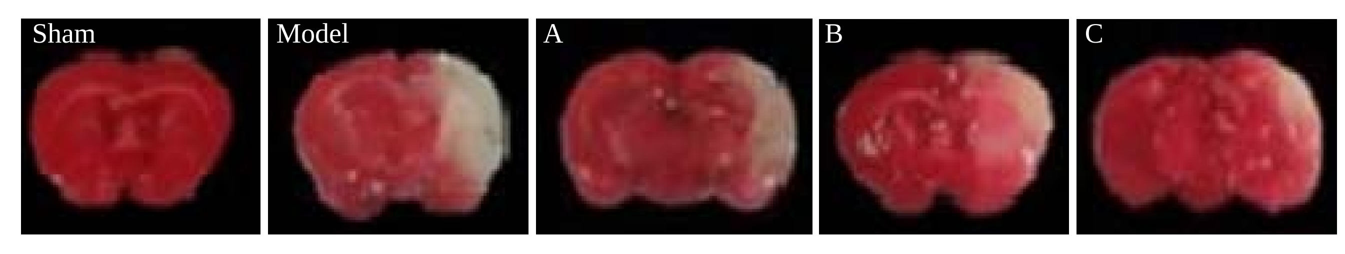


图1 肉眼所见不同组别大鼠的梗死脑组织

Fig.1 Infarcted brain tissue of rats in different groups under the naked eye.

2.3 Apelin-13对缺血-再灌注损伤大鼠脑组织含水量的影响

如图2结果所示，模型组脑组织含水量(82.34±0.83)%明显高于假手术组(73.27±0.63)%($P<0.05$)，提示大脑中动脉缺血再灌注后造成了明显的脑水肿。不同剂量的Apelin-13处理后，B组含水量(78.36±1.14)%、C组含水量(75.78±1.01)%明显低于模型组(82.23±0.83)%($P<0.05$)，A组含水量(81.32±0.91)%与模型组差异无统计学意义($P>0.05$)，提示中、大剂量Apelin-13能够减轻局灶性脑缺血再灌注损伤后脑组织水肿。

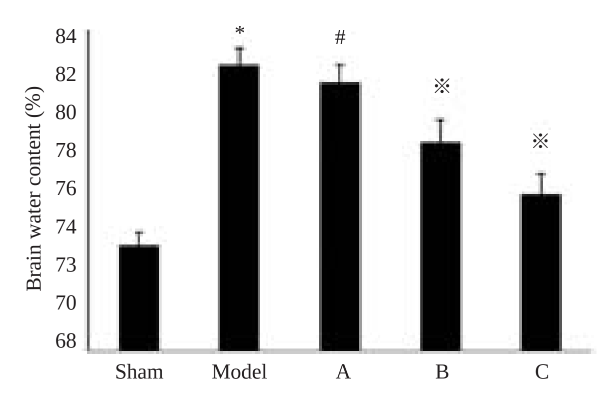


图2 各组脑组织含水量

Fig.2 Brain water content of different groups (%). *$P<0.05$ *vs* Sham group; [#]$P>0.05$ *vs* Model group; [※]$P<0.05$ *vs* Model group.

2.4 Apelin-13对脑缺血再灌细胞凋亡的影响

如图3结果所示，光镜下观察，假手术组脑组织切片见细胞形态完整，未见TUNEL阳性细胞。模型组梗死周围组织明显水肿、坏死，可见深染、固缩核细胞。运用Apelin-13干预后，C组TUNEL阳性细胞数(27.30±2.028/每高倍视野)、B组TUNEL阳性细胞数(31.48±3.178/每高倍视野)明显低于模型组(42.67±3.458/每高倍视野)($P<0.05$)；A组TUNEL阳性细胞数(40.74±1.158/每高倍视野)与模型组差异无统计学意义($P>0.05$)，提示中、大剂量Apelin-13能够减轻局灶性脑缺血再灌注损伤后的细胞凋亡。

2.5 Apelin-13对缺血周边区脑组织中MDA含量和SOD活性及ERK1/2蛋白水平的影响

如表2结果所示：与假手术组比较，模型组大鼠缺血周边区脑组织中MDA含量显著性增加，SOD活性显著性降低(均$P<0.05$)；与模型组比较，干预B、C组大鼠缺血周边区脑组织中MDA水平均显著降低，SOD活性均显著增加，以C组更加明显($P<0.05$)；干预A组脑组织中MDA含量及SOD活性与模型组比较没有显著性差异($P>0.05$)。

如图4结果所示，Western blotting结果显示，各实验组均有ERK1/2蛋白表达，模型组与假手术组相比，表达无统计学差异($P>0.05$)，提示局灶性脑缺血再灌注损伤对脑组织中ERK1/2蛋白总量无明显影响。Apelin-13干预后结果显示，各干预组与假手术组ERK1/2表达差异无统计学意义($P>0.05$)。另外各实验组均有p-ERK1/2表达，模型组和干预组p-ERK1/2蛋白表达高于假手术组($P<0.05$)，而且干预组高于模型组($P<0.05$)；提示局灶性脑缺血再灌注损伤后脑组织中ERK1/2蛋白磷酸化水平增强，Apelin-13干预后ERK1/2蛋白磷酸化水平增强更加明显。表明Apelin-13对局灶性脑缺血再灌注损伤后脑组织ERK1/2蛋白总量无明显影响，但能促进ERK1/2蛋白磷酸化。

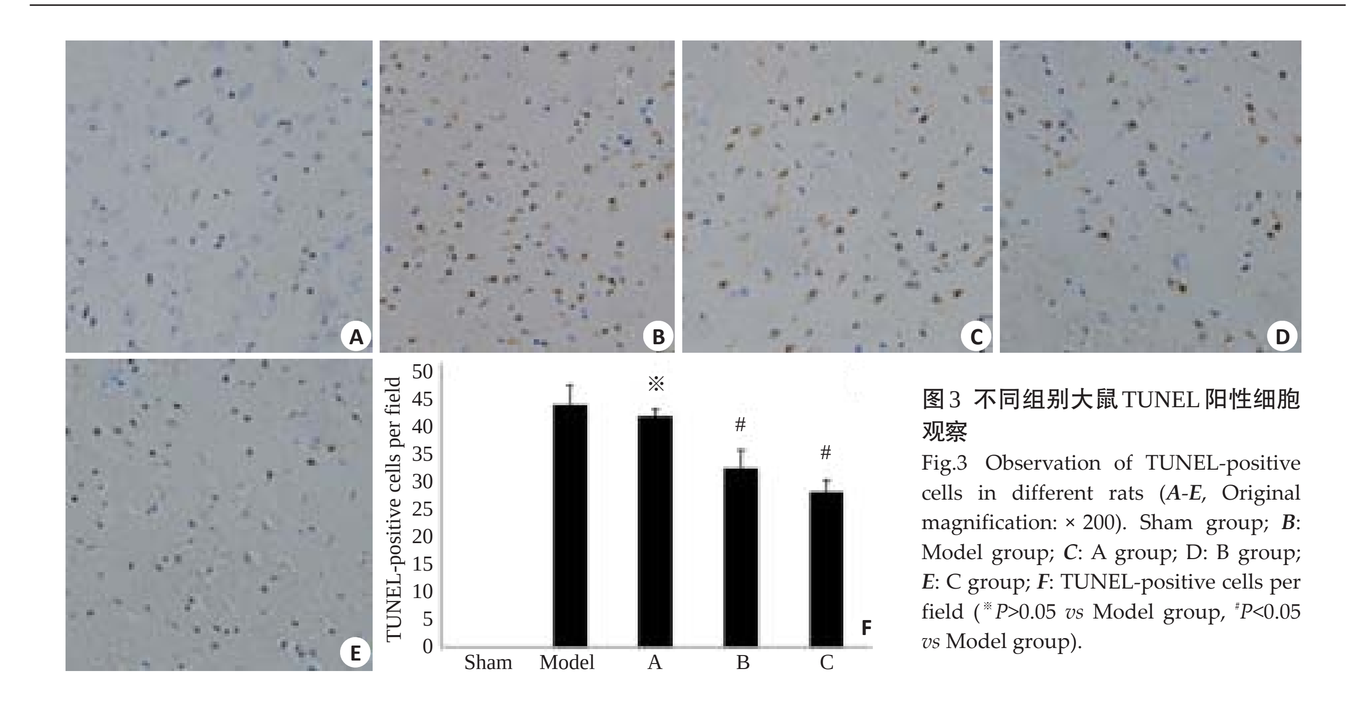


图3 不同组别大鼠TUNEL阳性细胞观察

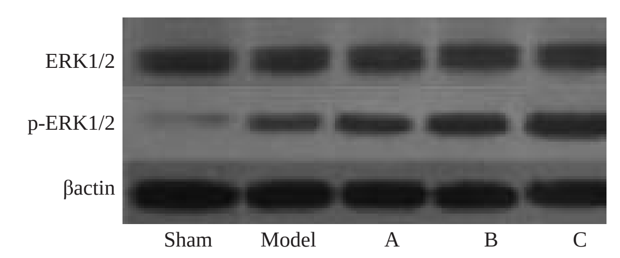
Fig.3 Observation of TUNEL-positive cells in different rats (*A-E*, Original magnification: × 200). Sham group; *B*: Model group; *C*: A group; D: B group; *E*: C group; *F*: TUNEL-positive cells per field (※P>0.05 *vs* Model group, #P<0.05 *vs* Model group).

表2 不同组别大鼠脑组织MDA含量和SOD活性

Tab.2 MDA content and SOD activity in different groups (n=5)

Group	SOD(U/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)
Sham group	325.68±19.21	12.54±2.34
Model group	112.32±15.28*	50.25±4.56*
A group	125.54±16.32#	48.32±3.68#
B group	250.25±18.02v	36.28±3.52v
C group	301.28±18.36v	20.12±2.84v

*P<0.05 *vs* sham group, #P>0.05 *vs* Model group, vP<0.05 *vs* Model group.



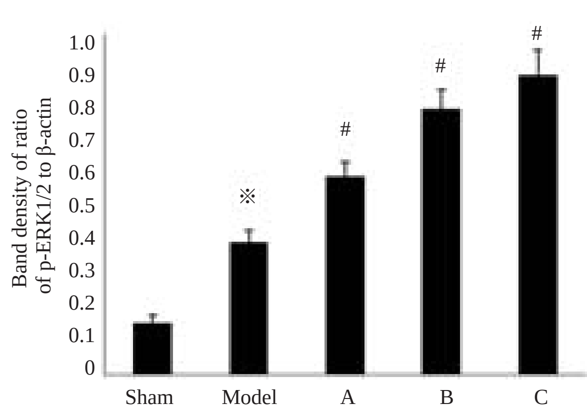


图4 不同组别大鼠ERK1/2和p-ERK1/2蛋白电泳情况

Fig.4 Expression of ERK1/2 and p-ERK1/2 in different rats. ※P<0.05 *vs* Sham group, #P<0.05 *vs* Model group.

3 讨论

动脉粥样硬化所致的心肌梗塞、脑梗塞等缺血性组织损伤是导致病人死亡的主要原因，研究表明缺血-再灌注损伤加重了脑缺血疾病对机体的损害[9]，增加了死亡率和致残率。其机理十分复杂，氧化应激、过量自由基的产生是重要原因[10-12]。再灌注神经损伤的严重程度主要取决于缺血梗死面积、持续时间以及内源性神经保护机制的启动。寻找一种新的安全有效的防治脑缺血-再灌注损伤的方法具有十分重要的意义。

Apelin是由Tatemoto等从牛的胃分泌物中分离纯化的一种小分子内源性神经肽，是血管紧张素受体样蛋白J受体（putative receptor protein related to the angiotensin receptor ATl, APJ）的天然配体。Apelin/APJ系统在神经元的胞体和神经纤维中均有大量的表达[13-14]，具有神经保护作用，能对抗兴奋性毒性损伤、氧化应激损伤，抑制神经细胞的凋亡等，是一种内源性神经保护因子。不同长度的Apelin多肽片段在体内的分布、与APJ的结合能力、体内外生理与药理作用都不尽相同。Apelin能抑制大脑皮质细胞中活性氧的产生、细胞色素C的释放以及caspase-3的激活，促进Akt和ERKl/2的磷酸化，抑制大脑皮质细胞凋亡，减少Ca^{2+}积聚，降低钙蛋白酶calpain的活化，保护大脑皮质神经元抵抗谷氨酸的兴奋性毒性损伤[15]。

Apelin前体肽在蛋白水解酶的作用下可分解为长度不同的多肽片段，以Apelin-13生物活性最强[16-17]。Apelin-13在神经系统的表达水平较高，与神经系统疾病的关系非常密切。本研究采用Apelin-13对脑缺血-再灌注损伤大鼠进行治疗，其结果显示，Apelin-13改善了脑缺血-再灌注损伤大鼠模型的临床症状、神经功能

缺损,增强肌力,显著性降低了脑组织的含水量和脑水肿的程度,也显著性降低神经功能评分和脑梗死体积和比例。同时本研究通过TUNEL染色对缺血周边脑组织神经细胞凋亡进行观察发现,中、大剂量Apelin-13干预后,TUNEL阳性细胞明显减少,表明Apelin-13可抑制局灶性脑缺血再灌注损伤后神经细胞凋亡。

机体在遭受有害刺激时出现氧化应激反应,产生了大量的活性氧自由基,超出了机体对其清除能力,从而对细胞的DNA、蛋白质和脂质等造成巨大的损伤。MDA是活性氧发生脂质过氧化的终产物,是衡量机体内细胞发生氧化应激的指标之一。SOD是清除体内活性氧自由基的主要自由基清除剂,通过催化超氧化物发生歧化反应而清除自由基[18]。本研究结果显示干预B组和C组通过Apelin-13处理明显抑制了缺血周边脑组织中氧化应激的产生,降低了MDA含量,显著增加了SOD的活性。结果表明Apelin-13抑制了氧化应激反应达到保护脑缺血-再灌注损伤。与以往的研究发现Apelin能通过抗氧化应激[19],对抗肌萎缩性侧索硬化症的进展,发挥神经保护作用相一致。

ERK介导的细胞信号转导通路可能是多种刺激的共同通路。本实验研结果显示,脑缺血再灌注后,脑组织中ERK1/2总量并未发生明显的改变,而ERK1/2磷酸化水平增强,说明ERK1/2的活化在脑缺血再灌注中扮演了重要角色。本实验对Apelin-13的研究中发现,Apelin-13处理对缺血再灌注脑组织有保护作用,表现在减轻神经功能缺损、脑水肿以及抑制细胞凋亡。同时发现Apelin-13处理后进一步增加了脑组织ERK1/2的磷酸化水平,提示p-ERK1/2可能在脑缺血再灌注后扮演着一个保护性的角色;同时也提示,Apelin-13干预在脑缺血再灌注后发挥一系列保护作用可能与ERK1/2蛋白活化相关。

总之,本研究表明Apelin-13对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤有保护作用,其机制可能与Apelin-13抑制氧化应激有关。Apelin-13是防治脑缺血-再灌注损伤的一种有效途径和新的方法,为脑缺血-再灌注损伤提供了新的治疗靶点和策略。

参考文献:

[1] Bell ML. Comment: temperature and risk of stroke mortality in China[J]. Neurology, 2013, 81(12): 1064-70.
[2] 武 菲, 张秋玲. Apelin/APJ系统的神经保护作用及其机制[J]. 生理科学进展, 2013, 44(1): 39-44.
[3] Pope GR, Roberts EM, Lolait SJ, et al. Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: species differences with rat[J]. Peptides, 2012, 33(1): 139-48.
[4] Zeng XJ, Yu SP, Zhang L, et al. Neuroprotective effect of the endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(11): 1773-83.
[5] Drougard A, Duparc T, Brenachot X, et al. Hypothalamic apelin/reactive Oxygen species signaling controls hepatic glucose metabolism in the onset of diabetes[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(4): 557-73.
[6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
[7] Yuluğ E, Türedi S, Karagüzel E, et al. The short term effects of resveratrol on ischemia-reperfusion injury in rat testis[J]. J Pediatr Surg, 2014, 49(3): 484-9.
[8] Dachir S, Shabashov D, Trembovler V, et al. Inosine improves functional recovery after experimental traumatic brain injury[J]. Brain Res, 2014, 1555(1): 78-88.
[9] Cong WT, Ling J, Tian HS, et al. Proteomic study on the protective mechanism of fibroblast growth factor 21 to ischemia-reperfusion injury[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2013, 91(11): 973-84.
[10] Tie R, Ji L, Nan Y, et al. Achyranthes bidentata polypeptides reduces oxidative stress and exerts protective effects against myocardial ischemic/reperfusion injury in rats[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(10): 19792-804.
[11] Xue L, Wu Z, Ji XP, et al. Effect and mechanism of salvianolic acid B on the myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7(4): 280-4.
[12] Kurtoglu T, Basoglu H, Ozkisacik EA, et al. Effects of cilostazol on oxidative stress, systemic cytokine release, and spinal cord injury in a rat model of transient aortic occlusion[J]. Ann Vasc Surg, 2014, 28(2): 479-88.
[13] Carpéné C, Dray C, Attané C, et al. Expanding role for the apelin/APJ system in physiopathology[J]. J Physiol Biochem, 2007, 63(4): 359-73.
[14] Lang L, Ingorokva S, Hausott B, et al. Selective up-regulation of the vasodilator peptide apelin after dorsal root but not after spinal nerve injury[J]. Neuroscience, 2010, 170(3): 954-60.
[15] Cook DR, Gleichman AJ, Cross SA, et al. NMDA receptor modulation by the neuropeptide apelin: implications for excitotoxic injury[J]. J Neurochem, 2011, 118(6): 1113-23.
[16] Hosoya M, Kawamata Y, Fulmsumi S, et al. Molecular and functional characteristics of APJ[J]. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin[J]. J Biol Chem, 2000, 275(28): 21061-7.
[17] Lee DK, Saldivia VR, Nguyen T, et al. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action[J]. Endocrinology, 2005, 146(1): 231-6.
[18] Hagar H, Al Malki W. Betaine supplementation protects against renal injury induced by Cadmium intoxication in rats: role of oxidative stress and caspase-3[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2014, 37(2): 803-11.
[19] Kasai A, Kinjo T, Ishihara R, et al. Apelin deficiency accelerates the progression of amyotrophic lateral sclerosis[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23968.

(编辑:经 媛)